

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-287686

(43) 公開日 平成4年(1992)10月13日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
15/18				
C 1 2 P 21/00	H	8214-4B		
// C 1 2 N 15/75		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-355272	(71) 出願人	591004261 エニリチエル・ソシエタ・ベル・アチオ ニ ENIRICERCHE SOCIETA PER AZIONI イタリア国ミラノ市コルソ・ベネチア16
(22) 出願日	平成3年(1991)12月20日	(72) 発明者	ジャンニ・フラスコツテイ イタリア国ミラノ市ピア・エ・ギニョウス 11
(31) 優先権主張番号	2 2 4 7 6 A / 9 0	(72) 発明者	パオラ・コスミーナ イタリア国ミラノ市ピア・レ・ミズラータ 14
(32) 優先日	1990年12月21日	(74) 代理人	弁理士 木村 正巳
(33) 優先権主張国	イタリア (I T)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無孢子性菌株バシラス・サチリス SMS275

(57) 【要約】

【構成】 孢子形成性に逆戻りする頻度が約 $10^{-6}$ より小であり、良好なプラスミド安定性を有するバシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) (CBS 432.90)。

【効果】 この菌株は、異質ポリペプチド及びタンパク質又はこれらの前駆体の製造で使用する宿主-ベクター系の宿主として利用される。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 胞子形成性に逆戻りする頻度が $10^{-8}$ より小であり、遺伝子性マーカー *leu*, *pyrD1*, *apr*<sup>-</sup> 及び *np r*<sup>-</sup>、及び *SpoII:D* を有することによって特徴づけられる、無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275 (CBS 432.90)。

【請求項2】 請求項1記載のものにおいて、組換えDNA技術による異質ポリペプチド及びタンパク質又はこれらの前駆体の製造に使用される宿主-ベクター系の宿主として使用されるものである、無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275。

【請求項3】 請求項2記載のものにおいて、前記ベクターが、異質ポリペプチド又はタンパク質又はこれらの前駆体をコード付ける遺伝子を含むバシラス・サチリス内において発現可能なプラスミドである、無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275。

【請求項4】 請求項3記載のものにおいて、前記プラスミドがヒト生長ホルモンの前駆体をコード付ける遺伝子を含有するものである、無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275。

【請求項5】 請求項4記載のものにおいて、前記プラスミドがpSM274 (CBS 75288) である、無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275。

【請求項6】 受託番号CBS 433.90で寄託されている請求項5記載の無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275 (pSM274)。

【請求項7】 異質ポリペプチド及びタンパク質又はこれらの前駆体を製造する方法において、バシラス属菌内で発現可能であり、前記異質ポリペプチド又はタンパク質又はこれらの前駆体をコード付ける遺伝子を含有するベクターによって形質転換させた請求項1記載の菌株バシラス・サチリス SMS275を、炭素源、窒素源、ミネラル塩、ロイシン及びウラシルを含有する培地中で生育させ、遺伝子発現生成物を回収することを特徴とする、異質ポリペプチド及びタンパク質又はこれらの前駆体の製法。

【請求項8】 請求項7記載の製法において、前記バシラス・サチリスがCBS433.90である、異質ポリペプチド及びタンパク質又はこれらの前駆体の製法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】 本発明は、無胞子性菌株バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) SMS275 (CBS 432.90) 及び異質生成物の製造のための宿主-ベクター系における宿主としての該菌株の使用に係る。

【0002】 当分野では、ある種の生産系（この用語は、タンパク質又はポリペプチドをコード付ける遺伝子を含有する発現ベクターと該ベクターを含有する宿主との組合せを意味する）を使用する発酵法によるタンパク質及びポリペプチドの製造が知られている。現在市場にある多くの（遺伝子）組換え生成物は、大腸菌 (*Escher*

2

*ichia coli*)、CHO細胞又はサッカロミセス・セレビシアエ (*Saccaromyces cerevisiae*) を宿主として使用した生産系の利用によって生成されたものである。

【0003】 しかしながら、これらの系は完全には満足できるものではなく、従って、当分野では、基本的には、たとえばバシラス属菌 (*Bacillus*) 及びストレプトミセス属菌 (*Streptomyces*) 又は酵母のような細菌、クルフェロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) 及びヤロヴィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) のような真菌又は昆虫細胞の如き宿主組織の使用に基づく異質生成物生産用の他の生産系を提供することが求められている。工業的見地からみて理想の生産系は、容易に精製され、天然のタンパク質と同じ生物活性を有する組換え生成物の生産を高収率かつ経済的に注目に値するコストで実施し得るものである。このような系は下記のもので構成される。

1) 細胞中にコピーが多数存在し、細胞内において目的の生成物が高収率で生産されるように安定して保存される強い調節エレメント（プロモーター及びターミネーター）を含有するベクター。

2) 異種遺伝子により提供される指令を正確に実行して、天然生成物と同一の生成物の生産を可能とし、商業レベルでの培養に好適である〔すなわち、耐性であり、高密度に増殖でき、栄養因子に関する要求があまり過酷でなく、安全（すなわち毒性の汚染物を生産しない）である〕宿主。

【0004】 現在、組換え生成物の生産用発現系の開発に当たりバシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) (以降、B. サチリスと表示する) が注目されている。実際、B. サチリスは、完全な非病原性であり、培地中に遺伝子発現生成物を分泌でき、大規模な生育が容易であるため、バイオテクノロジーの見地から特に注目される微生物である。医薬品工業及び食品工業にとって興味深い異質タンパク質及びポリペプチドの発現用宿主としてB. サチリスを使用することは、これら生成物の生産方法の許可を受けるための重要な要因である。しかしながら、微生物の使用に関する禁忌の1つは、ある種の生理的生育条件下における胞子形成の能力による。事実、化学的-物理的試薬に対する高い抵抗性によって特徴づけられる胞子は、最も一般的な環境条件下で生残る大きい可能性を有する。医薬及び食品の分野で興味深い生成物の製法においてB. サチリスの組換え菌株を使用することは、胞子が外部環境に分散される可能性が低いことを示さない場合には、法律上の規制を受けることになる。B. サチリスにおける内生胞子の形成は、細胞の生理系及び超微細構造における変化（生育栄養源が限定される条件に対する応答の結果として）によって生ずる細胞分化過程である。胞子形成（平均して37℃において6ないし8時間で行われる）の間に、細胞は一連の良好に限定された形態学的段階を受ける。この段階は胞子嚢内での

3

増殖形への交代細胞形である内生胞子の形成によって終わる。これらの段階（慣例的に段階0-VIIとして定義される）は、異なる遺伝子（spo遺伝子）によってコード付けられる一連の物質を要求する。当分野では、化学試薬又は物理試剤によるspo遺伝子の突然変異により、又はインビトロでの変異誘発技術の利用により胞子を生産しないB. サチリスの菌株（無胞子性菌株）を調製することが知られている。胞子の形成を生じなくなった突然変異体は、理論的には、異質タンパク質の生産に使用される。しかしながら、突然変異体のいくつかのものは、spo<sup>-</sup>表現型の不安定性、発現ベクターを安定に保存できないこと、菌株内に存在するベクターのコピー数が少ないことにより、B. サチリスの無胞子性発現用の系の開発に関して完全には満足できる宿主ではないことが明らかになっている。

【0005】発明者らは、上述の問題点を解消するB. サチリスの無胞子性突然変異体を新たに単離した。この突然変異体（SMS275として公知）は1990年10月5日付けでCentraalbureau Voor Schimmelculturesに寄託しており、その受託番号はCBS 432.90である。このように、本発明の目的は、無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275を提供することにある。本発明の他の目的は、異質生成物の生産用宿主-ベクター系における宿主としての該菌株の使用にある。本発明の他の目的は、異質生成物をコード付ける遺伝子を含有する発現ベクターによる無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275の形質転換、好適な培地中での形質転換菌株バシラス・サチリス SMS275の生育及びこのようにして生産された遺伝子発現生成物の分離及び精製を包含する所望の異質生成物の製法にある。特に、本発明による無胞子性菌株バシラス・サチリス SMS275は、遺伝子マーカー spoII:D<sup>-</sup>、Leu（ロイシンの不存在下では最小培地中で生育しない）、pyrD1（ウラシルの不存在下では最小培地中で生育しない）、a<sup>pr</sup><sup>-</sup>及びn<sup>pr</sup><sup>-</sup>（セリンプロテアーゼ及びニュートラルプロテアーゼを生育しない）によって特徴づけられる。該菌株はspo<sup>-</sup>表現型を安定して保存でき（実際のところ、胞子形成性への逆戻りの頻度は約10<sup>-8</sup>である）、複製可能な発現ベクターの多数のコピーを安定に保存できる。

【0006】本発明による無胞子性菌株を構成するに当たり使用できる方法は、B. サチリスの胞子形成菌株についてトランスポゾンにより突然変異を生じさせ、このようにして生成した無胞子性突然変異体を単離することからなる。トランスポゾンは、移動可能で、ゲノム内の異なった位置に挿入され、宿主の菌株に新たに遺伝性特性を付与するDNAのエLEMENTである。事実、ゲノム内の部位に挿入された後、トランスポゾン（抗生物質に対する耐性をコード付ける遺伝子を含有する）は遺伝子の配列を中断する（表現型突然変異によって表示される）と共に、宿主に特殊な抗生物質に対する耐性を付与する。本発明の1具体例によれば、トランスポゾンTN917

4

（Tomich及びClewell, J. Bacteriol., (1980), 141:1366-1574）（中でも、抗生物質のエリスロマイシン（Em）に対する耐性をコード付ける）を使用する。トランスポゾンの挿入による突然変異は、公知技術による接合又は形質転換によって行われる。特に、本発明による無胞子性菌株は、野生形（胞子形成性）の菌株B. サチリス SMS118を、バシラス属菌において複製されないものであって、トランスポゾンTN917を含有するプラスミドで形質転換させ、エリスロマイシンを添加した培地で突然変異菌株を選別することによって調製される。実際のところ、理論上では、トランスポゾンTN917が胞子形成性菌株の染色体DNA内に一体化されたクローンのみがこの培地で生育できる。

【0007】この目的に好適なプラスミドは、たとえばpTV1TS、pTV32TS、又はpTV51TS（Youngmannら, Regulation of Prokaryotic development, I. Smith, R. A. Sl epacky及びP. Settlow編, American Soc. for Microbiology, p65-87, 1989）である。一方、トランスポゾンTN917は、プラスミドpAD2 [Tomich及びClewell, J. Bacteriol., (1980), 141:1366-1574] から単離され、B. サチリス内で複製されないプラスミドに導入される。エリスロマイシン耐性クローンの非胞子形成特性を、光学顕微鏡での分析及び胞子形成培地上での直接表示（胞子を形成するコロニーは数日後には褐色に着色するが、無胞子性のコロニーは白色のままであり、溶菌する傾向がある）の両方によってテストした。分析したいくつかのEm耐性（Em）形質転換体はspo<sup>-</sup>表現型を示した。spoII:D遺伝子内における変異を含むspo<sup>-</sup>形質転換体の1つ（SMS275と称す）を、さらにleu、pyrD1、a<sup>pr</sup><sup>-</sup>及びn<sup>pr</sup><sup>-</sup>遺伝子型の安定性をチェックするためテストに供した。Leu及びpyrD1マーカーの分析を、ロイシン及びウラシルの不存在下及び存在下、最小培地で菌株SMS275を生育することによって行った。両化合物を含有する培地でのみ生育する菌株の能力はマーカーの安定性を示すものである。また、a<sup>pr</sup><sup>-</sup>及びn<sup>pr</sup><sup>-</sup>マーカーの分析を、カゼインを濃度1%で含有する最大培地（たとえばVY培地又はTBAB培地（DIFCO）など）で菌株SMS275を平板培養することによって行った。SMS275の周りに暈輪が存在しないことは、該菌株が2種のプロテアーゼを生産しないことを表示する。最後に、菌株SMS275のspo<sup>-</sup>表現型の安定性を、該菌株を高温で処理することにより検定した。このテストは、胞子を生成し得ない菌株（spo<sup>-</sup>表現型）は短時間の高温処理に対する抵抗性が低下するとの事実に基づくものである。熱処理は細胞を破壊するが、胞子を破壊しないため、平面培地上で生育するコロニーは、液体培地中での生育の間に生成され、最大培地上で平板培養される際に発芽し得る胞子に由来するものである。この目的のため、菌株SMS275を胞子形成培地において37℃で約24時間生育させ、ついで80℃で約10分間熱処理した。ついで、培養物の好適な希釈物を、カナマイシン及

びクロラムフェニコールを含有する最大培地で平板培養し、生きている細胞 (CFU) を計数した。データの分析結果は、菌株SMS275が $spo^-$ 表現型に逆戻りする頻度は $1 \times 10^{-8}$ より小であることを示した。このように、菌株B. サチリス SMS275は、所望の異質生成物の生産用宿主-ベクター系における宿主としての使用に特に適していると思われる。

【0008】本発明による方法は、たとえば無孢子性菌株を、所望の異質生成物をコード付ける遺伝子を含有する複製可能な発現ベクターで形質転換させ、このようにして形質転換した無孢子性菌株を好適な条件下で生育させ、最後に、得られた遺伝子発現生成物を単離し、精製することからなる。好適なベクターは、各種実験室及びコレクションセンターから利用できるB. サチリスにおいて複製可能なプラスミドの中から選択される。これらベクターによるB. サチリス SMS275細胞の形質転換は、常法の1つを利用して行われる。無孢子性菌株B. サチリス SMS275は、たとえば酵素 ( $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ等) の如き原核性ポリペプチド、又はたとえばインターロイキン、インターフェロン、ヒト生長ホルモン、又はこれらの前駆体の如き真核性ポリペプチドをコード付ける遺伝子の発現用宿主として有用である。本発明の1具体例によれば、ヨーロッパ特許公開第321940号に開示された如く、ヒト生長ホルモンの前駆体をコード付けるDNA配列を含有するプラスミド pSM274で菌株B. サチリス SMS275を形質転換させる。ついで、形質転換された菌株を、炭素源、窒素源及びミネラル塩を含有する培地において、光学密度 (波長600nmで測定) 約3-4まで生育させる。

【0009】つづいて、プラスミドの安定性及び菌株SMS275 (pSM274) のhGH前駆体の生産能力を測定する。その結果は、プラスミド pSM274が安定であること (多数のコピーが細胞中に存在する) を示した (図1)。さらに、菌株から抽出された総可溶性タンパク質の電気泳動分析では、ヒト生長ホルモンの前駆体に相当するバンドの存在を示した。菌株B. サチリス SMS275 (pSM274) の生存度を、グリセリン中に6カ月間維持した培地1ml当たりの生存細胞の数 (CFU/ml) の測定によって評価した。得られた結果は、これらが保持された条件下において細胞の生存度が良好であること及び $spo^-$ 表現型が安定であることを示した。プラスミド pSM274を含有する無孢子性菌株B. サチリス SMS275を1990年10月5日付けでCentraalbureau Voor Schimmelculturesに寄託しており、受託番号はCBS 433.90である。

【0010】後述の比較例は、SMS275以外のB. サチリス  $spo^-$  菌株をプラスミド pSM274で形質転換させる例を開示する。プラスミドの安定性及びベクターの数について及び $spo^-$ 表現型の安定性について分析を行った際、これらの菌株は下記の結果を示した。

- $spo0F$ 変異を有する菌株SMS268内では、プラスミド pS

M274は構造的には不安定である。

- $spoIIA1$ 変異を有する菌株SMS270内では、野生形菌株SMS118内におけるよりも少ないプラスミド pSM274のコピーが存在する。

- $spoIIF96$ 変異を有する菌株SMS272内では、プラスミドは安定であり、コピーの数は野生形菌株SMS118内におけるものに匹敵する。しかしながら、顕微鏡観察によって行った評価では、この菌株はかなり高い頻度で $spo^-$ 表現型を要求する傾向があった。

さらに、菌株SMS272は、たとえばグリセリン中に維持される際には、菌株SMS275 (pSM274) よりも生存度が低いことを示す。事実、グリセリンの添加後、培地1ml当たり生存細胞の数は $3.7 \times 10^7$  CFU/mlであり、7日後、この値は73%に低下し、19日後では68%に、40日後では約54%に低下した。これらの理由から、菌株SMS272は、工業的発酵処理における使用には適していない。

【0011】次に図面について詳述する。図1及び図2の写真はアガーロースゲル上で行ったプラスミド pSM274のDNAの電気泳動の結果を示すものである。図1において、1: pSM274コントロール (未消化)、2: EcoRI及びHind IIIで消化したpSM274コントロール、3: 菌株SMS275 (pSM274) から抽出したプラスミドDNA (未消化)、4: 菌株SMS275 (pSM274) から抽出し、EcoRI及びHind IIIで消化したプラスミドDNA、5: 分子量基準である。図2において、1-4: 菌株 $spoIID$  SMS275 (pSM274) の2つのクローンから抽出されたプラスミドDNAであって、1及び3は未消化のDNA、2及び4はEcoRI及びHind IIIで消化したDNAであり; 5-8: 菌株 $spoIIA1$  SMS270 (pSM274) の2つのクローンから抽出されたプラスミドDNAであって、5及び7は未消化のDNA、6及び8はEcoRI及びHind IIIで消化したDNAであり; 9は分子量基準であり; 10-13: 菌株 $spoIIF96$  SMS272 (pSM274) の2つのクローンから抽出されたプラスミドDNAであって、10及び12は未消化のDNA、11及び13はEcoRI及びHind IIIで消化したDNAであり; 14及び15: 菌株 $spo0F$  SMS228 (pSM274) の1つのクローンから抽出されたプラスミドDNAであって、14は未消化のDNA、15はEcoRI及びHind IIIで消化したDNAである。図3は、菌株SMS275 (pSM274) から抽出されたタンパク質の12.5%ナトリウムドデシルポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) における電気泳動の結果を示す写真である。図中、Aは標準 (部分的に精製したhGH前駆体) であり; BはhGH前駆体をコード付ける配列を含有しないコントロールプラスミド pSM214によって形質転換された菌株275から抽出されたタンパク質であり; C-F: プラスミド pSM274によって形質転換された菌株SMS275の4つのクローンから抽出されたタンパク質である。以下の実施例は本発明を説明するものであり、これらに限定されない。

【0012】実施例1

無孢子性菌株B. サチリス SMS275の構成

Contente及びDubnauによって開示された方法 (Mol. Genetics, (1979), 167: 251-258) に従い、トランスポゾンTn917を含有するプラスミドDNA pTV5TS (1  $\mu$ g) を使用してコンピテントB、サチリス SMS118細胞を形質転換させた。ついで、細胞をVY最大培地 (veal infusion) (veal infusion broth (DIFCO) 25g/リットル、酵母エキス 5g/リットル及び寒天 (DIFCO) 20g/リットル) 20ml 上で平板培養し、該プレート上にエリスロマイシン 125  $\mu$ g/ml を含有するソフト寒天 5ml を注加し、プレートを 37℃でさらに18時間インキュベートすることによって形質転換体を選別した。エリスロマイシン耐性 (Em) 形質転換体 (すなわち、染色体レベルで同種の組換えが行われたもの) を、胞子を形成しない能力に関するテストに供した。この目的のため、Em コロニーを、下記組成を有するSchaeffer胞子形成培地 (pH7.0) のプレート上に移し、37℃で生育させた。

普通ブロス(DIFCO)	8.0 g/リットル
KCl	1.0 g/リットル
MgSO <sub>4</sub>	1.25×10 <sup>-1</sup> g/リットル
寒天(DIFCO)	16.0 g/リットル
MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	0.98×10 <sup>-3</sup> g/リットル
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	2.78×10 <sup>-4</sup> g/リットル
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.42×10 <sup>-1</sup> g/リットル
H <sub>2</sub> O	1.0 リットル

数日後、光学顕微鏡での観察、及びコロニーの形態的変成の実施によって胞子の形成を測定した。胞子を形成したコロニーは実際に象徴的な褐色に着色し、一方、無胞子性のコロニーは透明のままであり、溶菌する傾向を示した。上述の如く得られた結果から、無胞子性表現型 (spo<sup>-</sup>) を有するいくつかのEm 形質転換体を単離することができた。spoII:D遺伝子内に変異を有するこれら形質転換体の1つをSMS275と表示した。

#### 【0013】実施例2

##### 菌株SMS275の特性表示

菌株SMS275について、さらに、遺伝子性マーカー apr<sup>-</sup>、npr<sup>-</sup>、leu、pyrD1及びspo<sup>-</sup>の安定性をチェックするため検定を行った。詳述すれば、(i) 生育培地における菌株のプロテアーゼ活性が低いこと (セリンプロテアーゼ遺伝子 (apr) 及びニュートラルプロテアーゼ遺伝子 (npr) が不活性化されたことを示す)、(ii) ロイシン及びウラシルの非存在下、最小培地において菌株が生育しないこと及び、(iii) 非胞子形性能をチェックするためテストを行った。カゼイン1%を含有するVY最大培地に菌株SMS272を平板培養することによりプロテアーゼ活性を測定した (Tomaら、J. Bacteriol., (1986), 147: 740-743)。セリンプロテアーゼ及びニュートラルプロテアーゼの作用によるコロニーの周囲における特徴的な加水分解暈輪の不存在は、これら2つの酵素が分泌されていないことを示す。菌株SMS275から単離されたコロニーはいずれも加水分解暈輪をもたない。しかしなが

ら、ロイシン (leu) 及びウラシル (pyrD1) に関する栄養要求については、P. YoungmanによりPlasmids: a practical approach, K. G. Hardy編, IRL Press, (1986), 79-103に記載された組成を有する最小培地 (生育ファクターを含まない)、leu (50  $\mu$ g/ml) のみ含有する最小培地、ウラシル (50  $\mu$ g/ml) のみ含有する最小培地、及び両方を含む最小培地で菌株を平板培養することによってコントロールテストを行った。両方の栄養ファクターを含有する培地でのみ生育が観察された。これより、遺伝子性マーカー leu及びpyrD1の安定性が確認された。最後に、細胞の総量に関連して生成する胞子の量を測定し、同時に、エリスロマイシンによる選択的圧力の不存在下におけるspo<sup>-</sup>表現型の安定性をチェックした。該分析は、胞子を生成し得ない菌株は短時間の高温処理に対する抵抗性が小さいとの事実に基づくものである。それぞれSchaeffer液状胞子形成培地10mlを収容するフラスコ (100ml) 2個に、それぞれ菌株SMS275及び胞子形成性菌株SMS181 (コントロール) を接種し、初めに37℃で24時間、ついで80℃で10分間インキュベートした。ついで、培養物の一定量を適当に希釈し、各希釈物0.1mlを、抗生物質を補充したVY最大培地で平板培養した。室温で生育後、生存する細胞 (CFU) を80℃での処理の前後で計数した。

【0014】加熱処理は細胞を破壊するが、胞子を破壊しないため、平板培地上で生育したコロニーは、37℃における液体培地中での生育の間に生成し、最大培地上で平板培養する際に発芽し得る胞子に由来するものである。表1は上記テストの結果 (CFU/mlで表示) を示す。

【表1】

希 釈	SMS118		SMS275	
	-	+	-	+
t. q.	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	0
10 <sup>-3</sup>	>10 <sup>4</sup>	141	>10 <sup>4</sup>	0
10 <sup>-4</sup>	>10 <sup>4</sup>	2	>10 <sup>4</sup>	0
10 <sup>-6</sup>	19	0	10	0

注1: 表中の数値は3回の測定結果の平均値である。

注2: t. q.: 希釈していない培養物 (0.1ml)

- : 加熱処理前

+ : 加熱処理後

データの分析から、下記の事項が認められる。

i) 37℃で生育させた菌株SMS118及びSMS275の培養物中に存在する細胞の数は、それぞれ1.9×10<sup>8</sup> CFU/ml及び1×10<sup>8</sup> CFU/mlである。

ii) 菌株SMS275がspo<sup>-</sup>表現型に逆戻りする頻度は1×10<sup>-5</sup>より小であり、熱処理に対して生残るSMS275及びSMS118の百分率の間の比率は0.001%より小である。

iii) 37℃、24時間後に生成され、最大培地で発芽し得る胞子の量は、胞子形成性菌株SMS118については1.4×10<sup>5</sup>であり、非胞子形成性菌株SMS275については0であ

る。

液状培地中、37℃での培養をエリスロマイシンの不存在下で行っているのであるから、80℃における熱処理後にSMS275コロニーが全く存在しないことは、菌株SMS275によって獲得された $spo^-$ 特性が非常に安定であることを示す。実際、細胞はトランスポゾンを持っていると思われるが、無孢子性表現型を保持している。

#### 【0015】実施例3

##### プラスミド pSM274による菌株SMS275の形質転換

コンピテントB、サチリス SMS275細胞をプラスミド pSM274 (10ng) で形質転換させ、ついで、カナマイシン 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及びクロラムフェニコール 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含有するVY最大培地のプレート上、37℃で18時間培養して形質転換体を選別した。Recombinant DNA Techniques: an introduction [Rodriguez及びTait編, Addison-Wesley Publishing Company, (1983), 164] に記載された急速抽出法によって耐性コロニーの1つから単離したプラスミドDNAの一定量を、制限酵素EcoRI及びHind III (BRL) により、該酵素の供給者の情報に従って消化した。ついで、消化したプラスミドDNA 2  $\mu\text{リットル}$  及び未消化の同じDNA 2  $\mu\text{リットル}$  を0.8%アガロースゲル上に負荷し、同様にプラスミド pSM274 (コントロール) (2  $\mu\text{リットル}$ ) (前記のものと同じ酵素で処理したもの及び処理していないもの) 及びいくつかの分子量基準を負荷した。図1に示す結果は、B. サチリス SMS275クローンから単離し、制限酵素で消化したプラスミド pSM274が予想される移動速度を示し、pSM274のものと一致する消化パターンを示すことを表した。実際、6700bp及び800bpの長さ (それぞれプラスミドベクター及びヒト生長ホルモンをコード付けるインサートに相当) を有する2つのフラグメントに相当する2つのバンドを、脱色後、臭化エチジウムで溶解させた。菌株B. サチリス SMS275 (pSM274) のhGB前駆体を生成する能力を、該菌株をVY培地10ml中、37℃で18時間生育させ、溶解させた細胞から抽出された可溶性の総タンパク質を12.5%SDS-PAGE上で電気泳動させ、クマシーブルーで染色することによって分析してチェックした。タンパク質抽出物中におけるヒト生長ホルモン前駆体に相当するバンドの存在が図3に見られる。

#### 【0016】比較例

##### spoIIF96、spoIIA1及びspoOF変異を有する無孢子性菌株の形質転換

それぞれspoIIF96、spoIIA1及びspoOF変異を有する無孢子性菌株B. サチリスSMS268、SMS270及びSMS272をプラスミド pSM274で形質転換させ、ついでプラスミドの安定性、存在するプラスミドのコピーの数及び $spo^-$ 表現型の安定性をチェックするためテストを行った。図2から見られるように、spoOF変異を有する菌株においてはプラスミド pSM274は不安定であり、spoIIA1変異を有する菌株内に存在するプラスミドのコピーの数は菌株SMS118

内よりも少ない。これに対して、spoIIF96菌株はプラスミドを安定状態で保持しており、そのコピー数は菌株SMS118の場合に匹敵するものである。しかしながら、 $spo^-$ の安定性をチェックするためにテストした際、この菌株は顕微鏡観察によって行った評価では、かなり高い頻度で $spo^-$ 表現型を要求する傾向を示した。

#### 【0017】実施例4

##### 無孢子性菌株SMS275及びSMS272の生存度の分析

菌株SMS275の生存度をチェックするため、グリセリン中で4つの細胞ブランクを調製した。実際には、菌株SMS275 (pSM274) 及び菌株SMS272 (pSM274) の予培養物 (100ml) 2つを下記処方のTYM培地中で調製した。

トリプトン	13g/リットル
酵母エキス	3g/リットル
マルトース	40g/リットル
カナマイシン	5mg/リットル
クロラムフェニコール	5mg/リットル

フラスコを220rpmで攪拌し、37℃で24時間インキュベートした。それぞれTYM培地1リットルを収容する2つの発酵槽 (2リットル) に、予培養物の1つを100ml接種した (初期光学密度 (O. D. ): 660nmにおいて0.190)。空気を0.5v/v/分で充填しながら、800rpm、pH7.0で発酵を行った。O. D. 3.0まで15時間発酵を行った後、培養物を遠心処理し、細胞を回収した。ついで、サンプル2mlにグリセリンを最終濃度15%となるまで補充し、-80℃に維持した。調製の日から6カ月後、グリセリン内におけるサンプル中の生存細胞 (コロニー形成単位-CFU) の量を測定した。このテストは、グリセリン中のサンプルの一定量を培地で希釈し、直ちに希釈物0.1mlを寒天を含有し、抗生物質 (カナマイシン及びクロラムフェニコール) を含有又は含有しないTBAB最大生育培地上で平板培養することによって実施される。SMS275 (pSM274) については、グリセリン中のサンプル1ml当たりの生存細胞数は $2.4 \times 10^8$  CFU/mlであった。該分析を抗生物質 (カナマイシン及びクロラムフェニコール) の存在下又は不存在下で実施した。これらの結果は、利用した保存条件下においてSMS275細胞の安定性及び生存率が良好であることを示した。しかしながら、SMS272 (pSM274) について得られたCFU値は生存率が低いことを示した。実際のところ、グリセリンの添加後では、 $3.7 \times 10^7$  CFU/mlの値が測定された。7日後、この値は73%に低下し、19日後では68%に、40日後では約54%に低下した。菌株SMS274 (pSM274) の培養物についても、実施例2及び3に記載の如く分析したところ、プラスミドは安定であり、hGB前駆体をコード付ける遺伝子の配列が無傷であることを示した。

#### 【図面の簡単な説明】

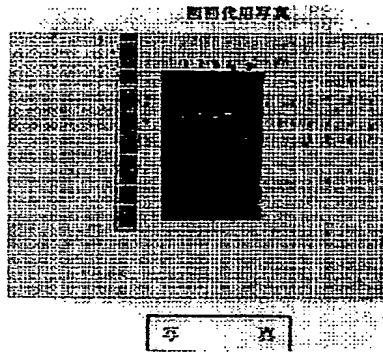
【図1】プラスミド pSM274のDNAの電気泳動の結果を示す写真である。

【図2】菌株spoIID SMS275 (pSM274) のクローンから

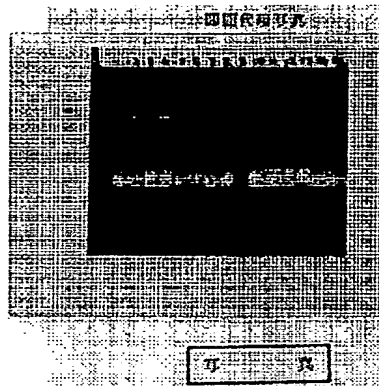
抽出されたプラスミドDNAの電気泳動の結果を示す写真である。

【図3】菌株SMS275 (pSM274) から抽出されたタンパク質の電気泳動の結果を示す写真である。

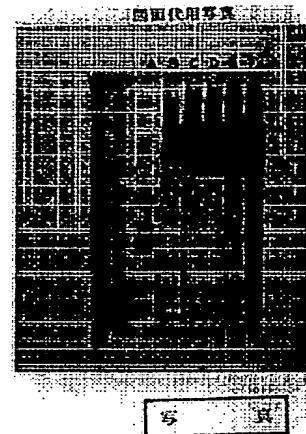
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

弁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:125)

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:125)

(72) 発明者 ギード・グランディ

イタリア国セグラテ・サン・フェリス市

ノーナ・ストラダ4